

NF- Bシグナル制御におけるHSP70/DNAJA3複合体の機能解析

著者	熊田 幸平
号	55
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	薬博(薬科)第83号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00129269

NF- κ B シグナル制御における HSP70/DNAJA3 複合体の機能解析

生命機能解析学分野 熊田 幸平

自然免疫は脊椎動物のみならず、昆虫や植物を含む全ての多細胞生物が普遍的に有している生体防御機構であり、感染防御の最前線で機能するだけでなく、獲得免疫の活性化に必須であることが明らかとされている。自然免疫制御の中心的な役割を果たす分子機構として Nuclear factor kappa B (NF- κ B) シグナル伝達経路が知られている。転写因子である NF- κ B は、病原体や傷害、ストレス(熱、紫外線、酸化ストレス) など、様々な刺激に応じて活性化され、標的遺伝子の発現を誘導することにより感染防御、細胞増殖や発生など様々な生命現象を制御している。NF- κ B シグナル伝達経路は多様な細胞外シグナルによって活性化されることから、その制御機構にも多様性があると考えられており、受容体の多様性がその一端を担っている。一方で、最終的な NF- κ B による標的遺伝子の発現制御はそれぞれの刺激に応じて変化する必要があるが、その制御機構についてはほとんど分かっておらず、NF- κ B 制御機構には未だ不明な点が多く残されている。そこで、新たな NF- κ B 制御機構の解明を目的に、本研究に着手した。

NF- κ B 経路の主要な構成因子は、ショウジョウバエから哺乳類まで保存されている。したがって、自然免疫シグナル伝達機構の解明において、自然免疫のみに依存した感染防御を行っており、さらに簡便かつ優れた遺伝学的実験手法が確立されているショウジョウバエを用いた解析が有効であると考えられる。そこで、当研究室では進化的に保存された新規自然免疫制御遺伝子の同定を目的として、ショウジョウバエを用いたゲノムワイドな機能獲得型のスクリーニングを実施しており、NF- κ B 経路を制御する新規因子として Droj2 を同定している。Droj2 はコシャペロンである DnaJ ファミリーに属するタンパク質であり、シャペロンである HSP70 と協調的に、変性タンパク質のリフォールディングやタンパク質の凝集抑制等を介して、タンパク質の恒常性維持に働いている。過去の研究から、シャペロン/コシャペロンの NF- κ B シグナル制御への関与は示唆されているが、その機能の全容は十分に明らかとなっていない。そこで本研究では、ショウジョウバエ及びヒト培養細胞においてシャペロン/コシャペロンである HSP70/DnaJ の NF- κ B シグナル制御における機能を解析することで、生物

全体に共通する新規自然免疫活性化機構を解明することを目的とした。

まず私は、Droj2 の自然免疫応答への関与を検証すべく、免疫組織特異的に Droj2 のノックダウンを行ったショウジョウバエ個体を用いて細菌感染実験を行った。その結果、Droj2 ノックダウン個体では、グラム陽性菌 *Staphylococcus saprophyticus* (*S. saprophyticus*) の感染に対してはコントロール個体と同程度の生存率を示したのに対し、グラム陰性菌である *Escherichia coli* (*E. coli*) 及び *Erwinia carotovora carotovora 15* (*Ecc15*) の感染に対しては、コントロール個体と比較して顕著な生存率の低下が認められた。細菌感染に対するショウジョウバエの自然免疫応答には、NF- κ B 経路を介した抗菌ペプチド産生が重要な役割を果たしている。そこで次に、Droj2 が抗菌ペプチドの発現に関与しているか検証した。その結果、Droj2 ノックダウン個体ではグラム陽性菌である *S. saprophyticus* 感染後の *Drosomycin* 発現量は、野生型個体と比較し有意な差は認められなかったのに対し、グラム陰性菌である *E. coli* や *Ecc15* 感染後の *Diptericin* 発現量は、コントロール個体と比較し有意に低下していた。グラム陰性菌感染に対する抗菌ペプチドの発現は、ショウジョウバエ NF- κ B 経路の 1 つである Imd 経路が担っている。そこで、Droj2 が Imd 経路の活性化のどの段階に寄与しているのかを検討すべく、エピスタシス解析を行ったところ、Droj2 は Imd 経路の転写因子である Relish に作用するか、その下流で機能することが明らかとなった。以上の結果から、Droj2 がショウジョウバエ NF- κ B 経路である Imd 経路の活性化に必要であり、抗菌ペプチド *Diptericin* の発現を介してグラム陰性菌感染に対する感染防御に必要な因子であることが明らかとなった。

これまでに当研究室の靱内修士が、ヒト培養細胞を用いた解析から、ヒト DnaJ タンパク質の 1 つであり、Droj2 と類似した構造を有する DNAJA3 が、NF- κ B シグナル活性化の重要なステップである I κ B α 及び NF- κ B p65 のリン酸化を制御することで NF- κ B 活性化に関与することを明らかにしている。しかし、その分子機構の詳細は明らかになっていないことから、私は DNAJA3 による NF- κ B 活性化の分子機構の解明を目指した。過去の研究から、I κ B α 及び NF- κ B p65 のリン酸化には、IKK (I κ B kinase) 複合体と I κ B α 及び NF- κ B の相互作用が重要であることが知られている。そこで、DNAJA3 が IKK 複合体と I κ B α 及び NF- κ B p65 の相互作用に関与するかを、IKK 複合体の構成因子の 1 つである IKK β に対す

る抗体を用いた免疫沈降実験から検証した。その結果、DNAJA3 ノックダウン細胞では、コントロール細胞と比較し、IKK β と I κ B α 及び NF- κ B p65 の相互作用が減弱した。このことから、DNAJA3 が IKK β , I κ B α , NF- κ B p65 の相互作用を介して NF- κ B 複合体の形成に関与する可能性が示唆された。

コシャペロンである DNAJA3 が NF- κ B シグナル制御に関与することから、シャペロンである HSP70 も NF- κ B 制御に関与する可能性が考えられる。そこで、HSP70 阻害剤である PES (pifithrin- μ) を処置した細胞を TLR5 (Toll-like receptor 5) リガンドである flagellin で刺激したところ、NF- κ B レポーター活性の上昇が PES 濃度依存的に抑制された。また、I κ B α 及び NF- κ B p65 のリン酸化への HSP70 の関与を検証したところ、PES を処置した細胞では flagellin 刺激依存的な NF- κ B p65 のリン酸化が濃度依存的に抑制されたが、I κ B α のリン酸化は抑制されなかった。さらに、HSP70 が NF- κ B 複合体形成に関与する可能性を検証すべく、PES を処置した細胞において抗 IKK β 抗体を用いた免疫沈降実験を行ったところ、コントロール細胞と比較し、IKK β と I κ B α 及び NF- κ B p65 の相互作用が減弱した。以上のことから、HSP70 が NF- κ B 複合体の形成、及び NF- κ B p65 のリン酸化を介して NF- κ B シグナル活性化に関与することが示唆された。

ヒト HSP70 ファミリーは 13 種類存在することが知られているが、いずれの HSP70 が NF- κ B シグナル活性化に関与するかは明らかになっていない。HSP70 は DnaJ との組み合わせにより機能や基質の選択性が規定されることから、NF- κ B 制御における HSP70 と DnaJ タンパクの組み合わせを特定することは、その分子メカニズムを解明する上で重要であると考えられる。そこで、C 末端側に FLAG タグを付加した DNAJA3 過剰発現させた HEK293 細胞において抗 FLAG 抗体を用いた IP を行い、co-IP するタンパク質から DNAJA3 と相互作用を示す HSP70 ファミリーの同定を試みた。検討の結果、DNAJA3-FLAG と co-IP する HSP70 として、HSPA1A, HSPA8, HSPA9 が検出された。これらの HSP70 について、NF- κ B 活性化への関与を検証すべく、それぞれをノックダウンした細胞において、flagellin 刺激を行い、NF- κ B レポーター活性に対する影響を検証したところ、いずれのノックダウンを行った細胞でも、NF- κ B レポーター活性の上昇が抑制された。このことから、HSPA1A, HSPA8, HSPA9 は、それぞれ NF- κ B シグナル経路の活性化に重要な役割を果たすことが示唆された。さらに、

それぞれの HSP70 について、I κ B α 及び NF- κ B p65 のリン酸化を制御するか検証したところ、HSPA1A 及び HSPA8 のノックダウンを行った細胞では、flagellin 刺激に伴う NF- κ B p65 のリン酸化が抑制されたが、HSPA9 のノックダウンを行った細胞では抑制されなかった。また、I κ B α のリン酸化はいずれの HSP70 のノックダウンでも抑制されなかった。以上の結果から、HSPA1A 及び HSPA8 が NF- κ B p65 のリン酸化を制御することで NF- κ B シグナル活性化に関与する可能性が示唆された。

ヒト培養細胞において、少なくとも HSPA1A 及び HSPA8 が NF- κ B 複合体に作用し、その活性化に寄与することが示唆されたが、これらの HSP70 が実際の細菌感染に対する自然免疫応答に関与するか明らかではなく、その分子機能が進化的に保存されているかも不明である。そこで、進化的に保存された HSP70 の自然免疫応答における役割を検証すべく、ヒト HSPA8 と最も相同性の高いショウジョウバエ HSP70 である HSC70-4 のノックダウン個体を用いた細菌感染実験を行った。その結果、HSC70-4 ノックダウン個体では、異なる 2 系統のいずれにおいても、グラム陰性菌である *Ecc15* 感染に対して、コントロール個体と比較し有意な生存率の低下が認められた。また、少なくとも 1 系統では、*Ecc15* 感染に対する *Diptericin* 発現の上昇が抑制された。これらの結果から、HSC70-4 が Droj2 と同様に、Imd 経路の活性化を介したグラム陰性菌に対する感染防御に必要な因子であることが示唆された。

本研究から、HSP70/DnaJ タンパク質による NF- κ B シグナル活性化機構が、無脊椎動物から脊椎動物にまで保存された普遍的な自然免疫制御機構であることが示唆された。さらに、ヒトにおいては HSPA1A/HSPA8 と DNAJA3 が、ショウジョウバエにおいては HSC70-4 と Droj2 がその役割を担うことが示唆され、NF- κ B 制御に関与する HSP70/DnaJ タンパク質の組み合わせの 1 つを明らかにすることができた。HSP70/DnaJ タンパク質には多様な組み合わせがあることから、リガンドに応じてその組み合わせを変え NF- κ B 複合体に作用することで、リガンド特異的な NF- κ B の機能を制御している可能性がある。本研究が NF- κ B 制御の多様性の理解につながる一歩となることを期待する。

論文提出者：熊田 幸平

論文審査委員（主査）：富岡 佳久

論文題目：NF- κ B シグナル制御における HSP70/DNAJA3 複合体の機能解析

自然免疫は、多細胞生物が普遍的に有する生体防御機構である。近年自然免疫が、感染防御だけでなく、動脈硬化や肥満といった疾患と密接に関係しており、これらの疾患が慢性炎症疾患として捉えられるようになった。Nuclear factor kappa B (NF- κ B) シグナル経路は、自然免疫を制御する中心的なシグナル伝達系である。外因性、あるいは内因性の多様なリガンドと、それに対応する自然免疫受容体により、NF- κ B シグナル経路は活性化されるが、それぞれ異なる応答を示す制御機構などはよく理解されていない。本研究は、NF- κ B シグナル制御における、シャペロンタンパク質 HSP70 と、そのコシャペロンである DnaJ の機能を、ヒト培養細胞系とショウジョウバエ個体を用いて明らかにした。

本研究では、まずショウジョウバエの遺伝学的スクリーニングから同定された Droj2 に着目した。Droj2 は DnaJ ファミリータンパク質の一員であり、DnaJ は、HSP70 と協調的に、タンパク質あるいはタンパク質複合体の安定化などに関わることが知られている。ショウジョウバエ個体を用いた感染実験により、Droj2 の発現抑制により、グラム陰性菌に対する感染抵抗性が低下する一方、グラム陽性菌に対する感染抵抗性には影響がないことが明らかとなった。これに呼応して、ショウジョウバエの二つの独立した NF- κ B シグナル経路である Toll 経路と imd 経路のうち、Droj2 の発現抑制により影響を受けるのは、グラム陰性菌に対する感染抵抗性を担う imd 経路のみで、グラム陽性菌に対する感染抵抗性を担う Toll 経路は影響を受けなかった。この際、Droj2 は imd 経路の転写因子 (NF- κ B ホモログ) である Relish の活性化、あるいはその下流で機能していることが示唆された。次に、Droj2 のヒトホモログとして同定された DNAJA3 の NF- κ B シグナルへの関与を調べたところ、DNAJA3 発現抑制細胞では、IKK β と I κ B α 及び NF- κ B p65 の相互作用が減弱し、DNAJA3 が NF- κ B 複合体の形成に関与する可能性が示唆された。次に、HSP70 に着目して解析した。ヒト培養細胞を用いた阻害剤での解析から、HSP70 が NF- κ B シグナル活性化に関与することが示唆されたため、DNAJA3 と相互作用を示す HSP70 として、HSPA1A、HSPA8、HSPA9 を同定した。これらはいずれもその発現抑制により、NF- κ B シグナル活性化が抑制され、NF- κ B シグナル制御に関わることが示唆されたが、HSPA1A と HSPA8 の発現抑制により、NF- κ B p65 のリン酸化が抑制されるのに対して、HSPA9 の発現抑制では影響がなく、これらの HSP70 が NF- κ B シグナル制御の異なる段階を制御している事が示唆された。次に NF- κ B シグナル制御における HSP70 の関与が進化的に保存されているかどうか確認するために、ショウジョウバエでの感染実験を行ったところ、HSPA8 のホモログである HSC70-4 の発現抑制により、グラム陰性菌に対する感染抵抗性が低下した。従って、本研究により、HSP70/DnaJ タンパク質による NF- κ B シグナル制御が進化的に保存されている自然免疫制御機構であることが明らかとなった。

よって、本論文は博士（薬科学）の学位論文として合格と認める。